

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia disebut sebagai negara megabiodiversitas karena memiliki keanekaragaman flora dan fauna yang sangat tinggi (Latapapua & Sahusilawane, 2023). Terdapat sekitar 30,000 spesies tanaman, dan sekitar 9,600 di antaranya memiliki potensi sebagai tanaman obat (Novaryatiin & Indah, 2019) yang dapat dikembangkan sebagai bahan baku industri farmasi maupun penelitian. Selain tumbuhan, hewan seperti lebah madu (*Apis mellifera*) juga memberikan manfaat besar, antara lain melalui produk alami seperti madu dan propolis.

Propolis merupakan produk apitherapeutic alami yang diproduksi oleh lebah madu di dalam sarangnya, dengan cara mengumpulkan resin dari kulit kayu, kuncup, dan pucuk tanaman. Propolis umumnya tidak larut dalam air, dan warnanya bervariasi tergantung pada sumber tanaman serta usia penyimpanannya. Secara umum, propolis berwarna kuning, hijau, atau coklat, dan digunakan oleh lebah sebagai antiseptik alami untuk melindungi sarang dari infeksi mikroba serta mencegah pembusukan (Anjum et al., 2019; Gavanji & Larki, 2017).

Propolis memiliki banyak kegunaan di bidang medis karena kandungan bahan aktifnya yang menunjukkan potensi yang luas melalui mekanisme antibakteri, antiinflamasi, dan imunomodulator yang saling mendukung. Menurut (Taufik et al., 2022) propolis mengandung lebih dari 200 senyawa bioaktif, terutama flavonoid (20%) dan polifenol (58%), yang berperan penting dalam aktivitas antibakterinya. Senyawa ini bekerja dengan cara merusak lapisan pelindung sel bakteri (membran dan dinding sel), menghambat pembentukan protein, serta mengganggu proses perkembang biakan bakteri.

Selain itu, kandungan flavonoid dan polifenol dalam propolis dapat meningkatkan ekspresi peptida antimikroba alami, seperti defensin dan hymenoptaecin, melalui aktivasi sel imun bawaan yang berperan penting dalam pertahanan tubuh terhadap infeksi (Nilawati Usman et al., 2016). Sejalan dengan hal tersebut, menurut penelitian oleh Primaguna et al. (2024) melaporkan bahwa propolis menghambat jalur pensinyalan NF- κ B, menurunkan produksi sitokin proinflamasi (TNF- α dan IL-6), serta melindungi fungsi ginjal melalui penurunan biomarker CysC dan ACE2. Aktivitas antioksidan propolis juga membantu mengurangi stres oksidatif, sehingga kombinasi mekanisme ini dapat menekan peradangan, melindungi organ, dan mendukung keseimbangan metabolisme.

Senyawa flavonoid merupakan metabolit sekunder fenolik, dengan struktur cincin benzena yang tersubstitusi oleh gugus hidroksil (-OH). Senyawa ini merupakan kelompok metabolit sekunder terbesar di alam dan dapat ditemukan pada akar, kulit kayu, daun, batang, buah, dan bunga. Flavonoid berasal dari kerangka dasar 2-fenilbenzopiron (*2-phenylchromen-4-one*), yang biosintesisnya berlangsung melalui jalur fenilpropanoid (Mierziak et al., 2014). Namun, senyawa ini mudah teroksidasi pada suhu tinggi sehingga tidak tahan panas. Flavonoid umumnya bersifat polar karena sebagian besar ditemukan dalam bentuk glikosida, yaitu flavonoid yang terikat dengan gugus gula (Rompas, 2012).

Glikosida merupakan kelompok metabolit sekunder yang tersusun dari dua bagian, yaitu gugus gula (glikon) dan non-gula (aglikon), yang terikat melalui ikatan glikosidik. Ikatan ini umumnya berupa ikatan O-glikosidik, meskipun dapat juga berupa ikatan C-, N-, atau S-glikosidik. Glikosida banyak terbentuk melalui reaksi antara gugus hidroksil pada gula dengan gugus fungsional dari aglikon (Wang et al., 2014).

Kandungan propolis sangat dipengaruhi oleh spesies lebah, kondisi geografis, serta sumber pakan dan tanaman (Pahvalani et al., 2020). Untuk identifikasi senyawa dalam propolis, teknik kromatografi seperti KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dan instrumen LC-MS/MS-QTOF (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Quadrupole Time-of-Flight) sangat sesuai. KLT memisahkan senyawa berdasarkan kepolaran dengan prinsip "like dissolves like" dan digunakan sebagai metode screening awal (Ahsan, 2022). LC-MS/MS-QTOF adalah instrumen analitik yang menggabungkan kromatografi cair (LC) dengan spektrometri massa (MS) tipe quadrupole time of flight (QTOF) yang termasuk kedalam teknologi instrumentasi High resolution mass spectrometers (HRMS) dengan hasil pengukuran massa yang akurat, selain itu memungkinkan analisis ratusan senyawa dalam satu pemindaian dengan fragmentasi mode MS^E untuk identifikasi struktur molekul bioaktif secara akurat (Harmita et al., 2019).

Propolis menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap berbagai mikroorganisme, termasuk *Pseudomonas aeruginosa*, bakteri Gram-negatif patogen yang dapat membentuk biofilm dan menyebabkan infeksi serius pada luka kronis, luka bakar, atau individu dengan sistem imun lemah (Wang

et al., 2014). Aktivitas antibakteri propolis dapat diuji menggunakan metode difusi cakram (paper disk), di mana kertas cakram steril diimpregnasi larutan propolis dan ditempatkan pada media agar yang telah diinokulasi bakteri uji. Zona hambat yang terbentuk digunakan untuk menilai efektivitas antibakteri.

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti tertarik melakukan penelitian untuk menguji aktivitas antibakteri propolis terhadap *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan metode difusi cakram (paper disk), serta mengidentifikasi kandungan flavonoid dan glikosida pada propolis (*Apis mellifera*) asal Sulawesi Selatan dengan metode KLT dan LC-MS/MS-QTOF.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah senyawa flavonoid dan glikosida pada propolis (*Apis mellifera*) asal Sulawesi Selatan dapat diidentifikasi dengan metode KLT dan LC-MS/MS-QTOF?
2. Bagaimana efektivitas propolis dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* berdasarkan pengukuran zona hambat menggunakan metode difusi paper disk?

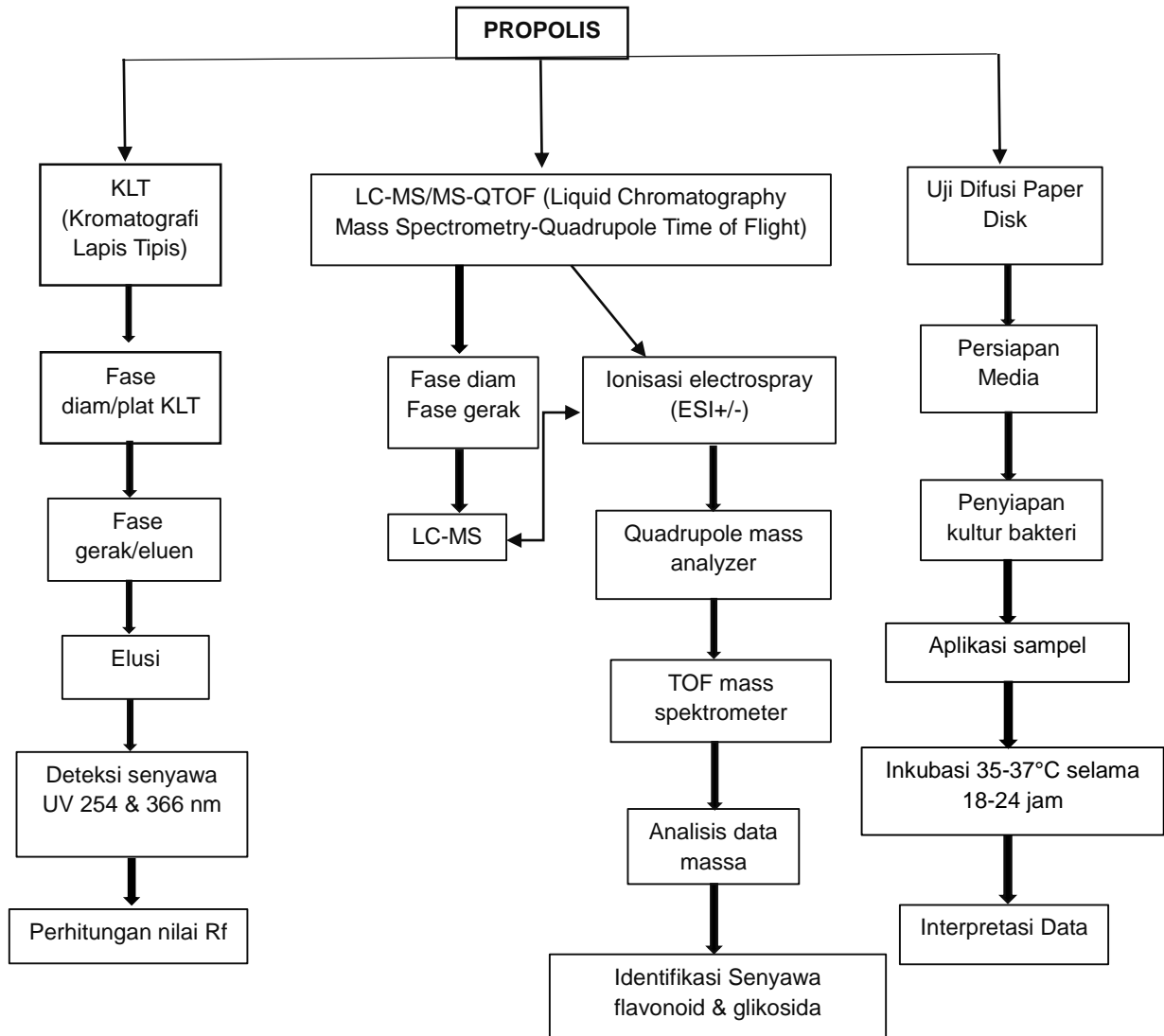
1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengidentifikasi senyawa flavonoid dan glikosida pada propolis (*Apis mellifera*) asal Sulawesi Selatan.
2. Menilai potensi propolis sebagai agen antibakteri alami terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

1.4 Manfaat Penelitian

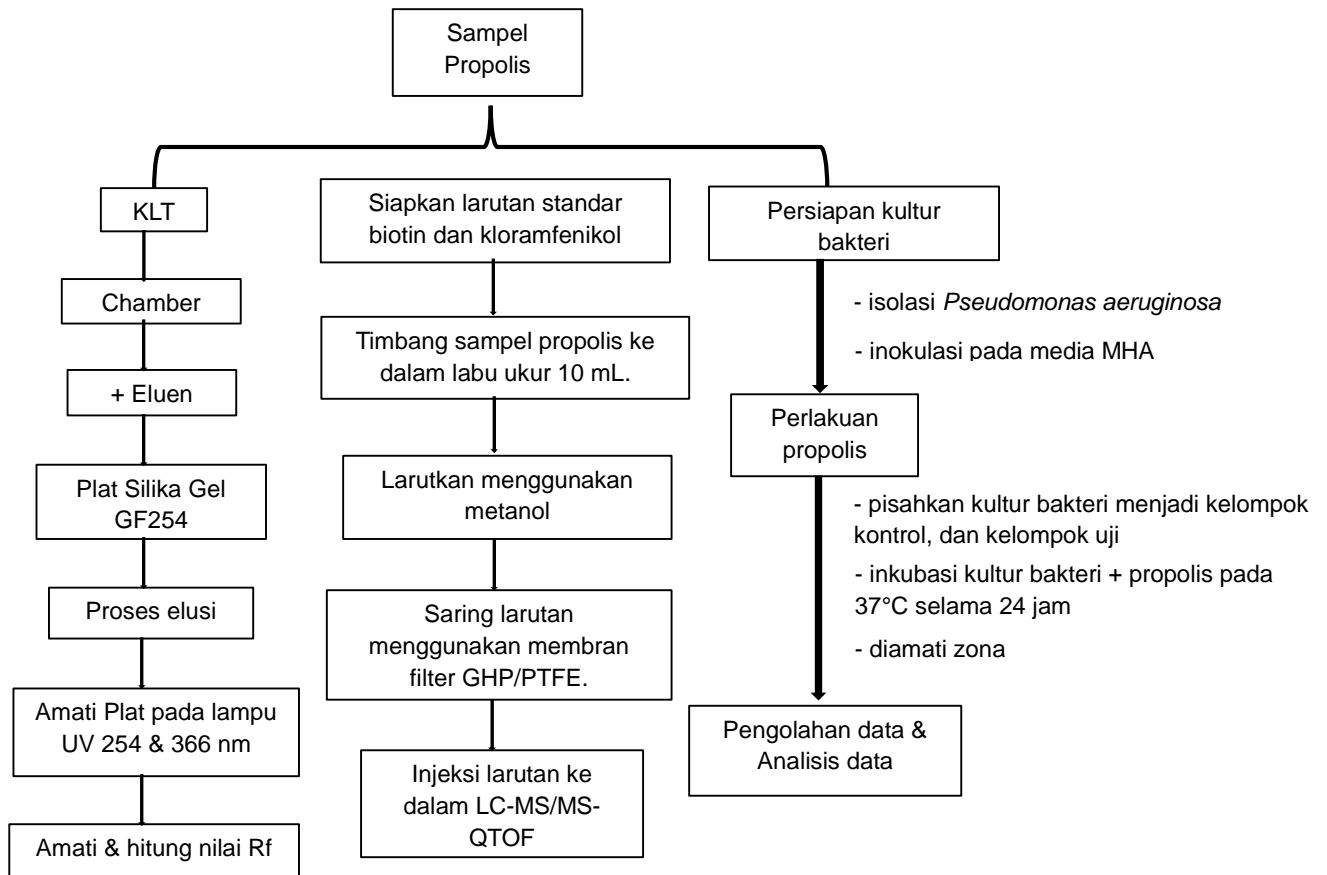
1. Manfaat Teoretis
Memberikan informasi ilmiah mengenai kandungan senyawa flavonoid dan glikosida dalam propolis (*Apis mellifera*) asal Sulawesi Selatan serta aktivitas antibakterinya.
2. Manfaat Praktis
Menjadi dasar ilmiah pemanfaatan propolis sebagai agen antibakteri alami, khususnya terhadap *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Manfaat Akademis
Menjadi referensi bagi peneliti selanjutnya dalam mengembangkan penelitian mengenai potensi propolis sebagai bahan obat herbal atau alternatif antibakteri alami.

1.5 Kerangka Teori



Gambar 1. Kerangka Teori

1.6 Kerangka Konsep



Gambar 2. Kerangka Konsep

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental berskala laboratorium dengan desain penelitian mengidentifikasi komponen kimiawi dalam sampel dan menguji daya hambat propolis sebagai agen antibakteri. Desain penelitian ini dipilih untuk melakukan identifikasi senyawa flavonoid dan glikosida pada propolis menggunakan teknik KLT, dan LC-MS/MS-QTOF, serta uji difusi untuk menilai potensi propolis sebagai agen alami antibakteri.

2.2 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di tiga lokasi berbeda. Analisis menggunakan KLT dilakukan di Laboratorium Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin. Analisis LC-MS/MS-QTOF sampel akan dikirimkan di PT. Saraswanti Indo Genetech (SIG), Bogor, Indonesia (Nomor Registrasi: LP-184-IDN). Uji difusi paper disk terhadap bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin.

Penelitian ini direncanakan berlangsung selama tujuh bulan, yaitu pada Februari hingga Agustus 2025. Rentang waktu tersebut dipilih untuk memastikan persiapan yang optimal serta pelaksanaan analisis dan identifikasi secara cermat.

2.3 Populasi dan Sampel

Propolis merupakan bagian dari lebah madu (*Apis mellifera*) yang diperoleh dari peternakan lebah di kecamatan Masamba, Sulawesi Selatan, Indonesia.

2.4 Alat dan Bahan

2.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam pengujian Kromatografi Lapis Tipis (KLT), chamber dan lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.

Alat yang digunakan dalam analisis senyawa bioaktif LC-MS/MS-QTOF tipe XEVO G2-XS QTOF.

Alat yang digunakan dalam uji difusi, cawan petri, oven, inkubator, dan jangka sorong.

2.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan Plat Silica Gel GF254 (Merck®), asam asetat 10%, etil asetat, n-heksan, aquades, metanol, $AlCl_3$, asam sitroborat, $FeCl_3$, Dragendorff, Vanilin-Asam Sulfat, H_2SO_4 , dan medium Mueller-Hinton Agar (MHA), ciprofloxacin 30 μ g (Oxoid®), paperdisk (Oxoid®), dan *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9721™).

2.5 Prosedur Kerja

2.5.1 Penyiapan Sampel

Sampel propolis dari *Apis mellifera* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari peternak lebah di kecamatan Masamba, Sulawesi Selatan. Propolis diperoleh dengan mengikis kerangka sarang lebah, lalu didinginkan pada suhu $-20^\circ C$ dan diolah menjadi bentuk serbuk.

Timbang 300g propolis bubuk dengan etanol 70% (1:10 w/v) diekstraksi dengan cairan pelarut EtOH, menggunakan metode Ultrasonic Assisted Extraction (UAE) selama 20 menit pada suhu $20^\circ C$. Selanjutnya pelarut disaring menggunakan kertas saring, sisa ekstrak (residu) diekstraksi kembali dengan cara yang sama sebanyak 2 kali. Cairan penyari yang mengandung ekstrak diuapkan menggunakan rotary evaporator untuk menghasilkan propolis pekat.

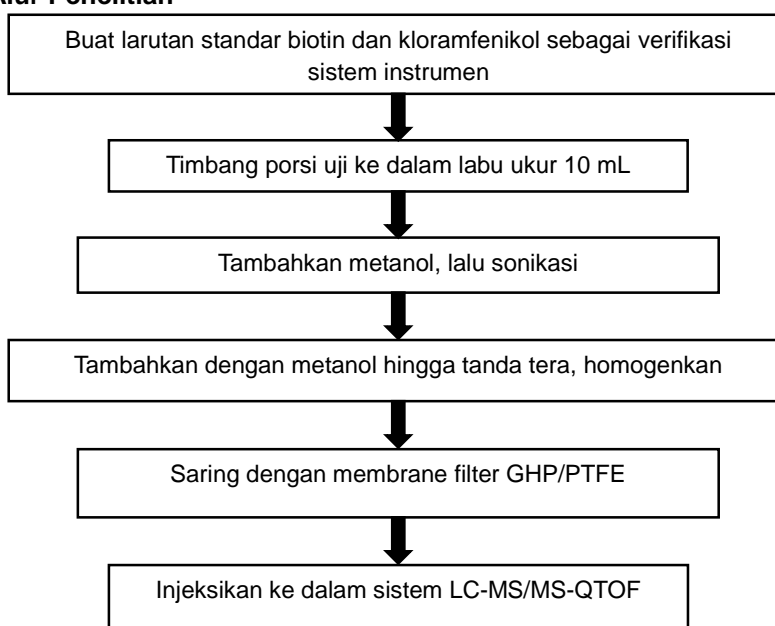
2.5.2 Pengujian KLT (Kromatograf Lapis Tipis)

Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan menggunakan plat silika gel GF254 (7 x 2 cm) yang diaktivasi pada suhu $100^\circ C$ selama 30 menit. Sampel ditotolkan pada plat dengan batas atas 0,5 cm dan batas bawah 1 cm. Fase gerak yang digunakan adalah n-heksan : etil asetat (3:1) dan asam asetat 10%. Setelah proses elusi, plat dikeringkan dan diamati di bawah sinar UV (254/366 nm) dan reagen visualisasi seperti $AlCl_3$, Asam sitroborat, $FeCl_3$, Dragendorff, Vanilin-Asam Sulfat, dan H_2SO_4 , disemprotkan untuk menghasilkan warna atau fluoresensi spesifik. Nilai Rf dihitung untuk membandingkan hasil dengan standar.

2.5.3 Pengujian LC-MS/MS-QTOF

Persiapan larutan standar biotin dan kloramfenikol sebagai kalibrasi dan verifikasi sistem instrumen. Untuk sampel ekstrak propolis ditimbang ke dalam labu ukur 10 mL, dilarutkan dengan metanol, disaring menggunakan membran filter GHP/PTFE untuk menghilangkan partikel besar sebelum diinjeksi ke LC-MS/MS-QTOF. Analisis dilakukan dengan kolom LC HSS T3 pada suhu 40°C untuk memperoleh pemisahan optimal, sistem gradien menggunakan fase A (asam format 0,1% dalam asetonitril) dan fase B (asam format 0,1% dalam akuabides) dengan laju alir 0,6 mL/menit. Untuk metode MS instrumen dioperasikan pada mode ToF MS^e dengan ionisasi ESI (+) dan (-) untuk menangkap spektrum penuh senyawa polar maupun non-polar, pada rentang m/z sesuai target analit. Hasil analisis diolah untuk identifikasi senyawa berdasarkan nilai m/z dan pola fragmentasi, lalu dibandingkan dengan pustaka senyawa (Natural product library). Konsentrasi ditentukan dari luas area puncak terhadap kurva kalibrasi (Qiao et al., 2013).

2.5.4 Diagram Alur Penelitian



Gambar 3. Diagram Alur Penelitian

2.5.5 Analisis Data LC-MS/MS-QTOF

Screening zat aktif bahan alam menggunakan instrument LC-MS/MS-QTOF yang dilakukan dengan perangkat lunak UNIFI yang didalamnya telah memiliki natural product library spektrum massa dan hasil dinyatakan sebagai positif atau negatif dengan kriteria sebagai berikut :

Tabel 1. Nilai Hasil Interpretasi LC-MS/MS-QTOF

Kriteria	Positif	Positif Low Abundance	Negatif
mass error	≤ 5 ppm	≤ 5 ppm	> 5 ppm
isotope match M/Z	≤ 6 ppm	≤ 6 ppm	> ppm
RMS PPM	≤ 10 %	≤ 10 %	> 10 %
RMS %			
Intensity/response	≥ 300 ppm	< 300	< 300
Fragment match	≥ 1 mass fragment	≥ 1 mass fragment	< 1 mass fragment

2.6 Pengujian Aktivitas Antibakteri

2.6.1 Pembuatan Media Muller Hinton Agar (MHA)

Media MHA (Muller Hinton Agar) dibuat dengan menimbang sejumlah 4,75 gram kemudian dilarutkan dalam 125 mL aquades, bila perlu dengan bantuan pemanasan. Selanjutnya media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Media MHA dituangkan pada cawan petri steril, diamkan pada suhu ruangan hingga memadat.

2.6.2 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Bakteri yang telah diremajakan disuspensikan dengan pengenceran bertingkat menggunakan larutan NaCl 0,9%. Setiap pengenceran dicocokkan kekeruhannya dengan larutan standar 0,5 McFarland dan digunakan sebagai inokulum.

2.6.3 Tahapan Pengujian Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri propolis terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media Mueller-Hinton Agar (MHA) untuk memastikan pertumbuhannya. Setelah pertumbuhan bakteri terlihat, kultur dibagi menjadi beberapa kelompok, yaitu kelompok kontrol positif (disk antibiotik ciprofloxacin), kontrol negatif, dan kelompok uji propolis dengan konsentrasi 0,25%, 0,5%, dan 0,75%. Selanjutnya, semua kelompok diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian, diamati untuk menentukan kemampuan propolis dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

2.6.4 Pengolahan Data

Dalam penelitian ini, data dianalisis menggunakan One-Way Analysis of Variance (ANOVA) untuk mengevaluasi perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Analisis dilakukan dengan bantuan perangkat lunak GraphPad Prism versi 10. Uji One-Way ANOVA bertujuan untuk memverifikasi variasi efektivitas antar kelompok berdasarkan variabel yang diteliti, dengan tingkat signifikansi sebesar 0,05.